

Aus dem Klin. -Chemischen Labor  
(Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)  
der Universitäts-Nervenlinik Marburg/Lahn  
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

---

# Erprobung eines neuen quantitativen Screening Tests zur Messung der Glycosaminoglycane im Urin von gesunden und kranken Personen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
ANDREA FRIED  
aus Diez/Lahn

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Aus dem Klin. -Chemischen Labor  
(Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)  
der Universitäts-Nervenlinik Marburg/Lahn  
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

---

# Erprobung eines neuen quantitativen Screening Tests zur Messung der Glycosaminoglycane im Urin von gesunden und kranken Personen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
ANDREA FRIED  
aus Diez/Lahn

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 16. 12. 1977  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Dekan: Prof.Dr. F. Neurath  
Referent: Prof.D. T.O. Kleine  
Correferent: Prof.Dr. G. Sturm

| Inhaltsangabe                                                                                                           | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A EINLEITUNG                                                                                                            | 1     |
| B METHODIK                                                                                                              | 2     |
| I. Patientengut                                                                                                         | 2     |
| II. Vorbereitung des Urins                                                                                              | 3     |
| 1. Bestimmung des Kreatiningehaltes                                                                                     | 4     |
| 2. Bestimmung von Glucose                                                                                               | 4     |
| 3. Nachweis von Urobilinogen                                                                                            | 4     |
| 4. Untersuchung des Urinsediments                                                                                       | 4     |
| 5. Griess'sche Probe                                                                                                    | 5     |
| III. Methoden zur Bestimmung von Glycosaminoglycanen<br>im Urin                                                         | 5     |
| 1. Semi-quantitativer Screening Test mit Toluidin-Blau<br>getränktem Papier                                             | 5     |
| 2. Quantitative Bestimmung von Glycosaminoglycanen<br>im Urin mit Alcian Blue 8GX                                       | 6     |
| 3. Aufnahme von Spektren gefärbter Glycosaminoglycane                                                                   | 8     |
| IV. Eichlösungen                                                                                                        | 9     |
| V. Bausteinanalysen von Glycosaminoglycanen                                                                             | 10    |
| 1. Methode zum Nachweis von Uronsäuren                                                                                  | 10    |
| 2. Methode zur Bestimmung von Hexosaminen                                                                               | 10    |
| VI. Statistische Methoden                                                                                               | 12    |
| C ERGEBNISSE                                                                                                            | 14    |
| I. Methodenvergleiche                                                                                                   | 14    |
| 1. Quantitative Bestimmung von Glycosaminoglycanen<br>mit Alcian Blue 8GX mit Ansatz A,B,C                              | 14    |
| 2. Semi-quantitativer Screening Test mit Toluidin-Blau<br>Papier im Vergleich zur quantitativen Alcian Blue-<br>Methode | 18    |
| II. Charakterisierung der Alcian Blue 8GX-Methode (Ansatz C)                                                            | 18    |
| III. Aufstellung von Normalwerten für die modifizierte<br>Alcian Blue 8GX-Methode (Ansatz C)                            | 22    |
| IV. Ausscheidung von Glycosaminoglycanen bei Probanden<br>mit verschiedenen Erkrankungen                                | 22    |
| D DISKUSSION                                                                                                            | 40    |
| E ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                       | 43    |
| F LITERATURNACHWEIS                                                                                                     | 45    |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552328\\_0025](https://archive.org/details/IA41552328_0025)

## A EINLEITUNG

Im menschlichen Urin werden im Durchschnitt 10 mg Glycosaminoglycane ausgeschieden (30), d.h. etwa 0,1% des gesamten Glycosaminoglycangehaltes des menschlichen Körpers. 60-80% der nicht-filtrierbaren Glycosaminoglycane des Urins sind Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Dermatansulfat zuzuordnen, der Rest besteht aus Heparansulfat (5-15%), Keratansulfat (1-18%) und nichtsulfatierten sauren Polysacchariden (7,20,39,41).

Über den Stoffwechsel der Glycosaminoglycane ist beim Menschen relativ wenig bekannt (vgl. 12,30,40), was einmal auf zeitraubende quantitative Bestimmungsmethoden zurückzuführen ist; zum anderen auf z.T. ungenaue Screening-Tests. Deshalb soll in dieser Arbeit ein quantitativer Screening Test zur Erfassung möglichst aller Glycosaminoglycane im Urin ausgearbeitet und seine Verwendbarkeit im klinischen Routinelabor geprüft werden. Der Test beruht auf der von J.Scott erstmals beschriebenen quantitativen Fällung saurer Glycosaminoglycane mit dem kationischen Farbstoff Alcian Blue 8GX (33). Die anschliessende Lösung des Glycosaminoglycan-Alcian Blue-Komplexes mit Manoxol, einem Dibutylester von Sulfsuccinat (42), ermöglicht die quantitative Messung der sauren Glycosaminoglycane z.B. im Urin.

## B METHODIK

### I. Patientengut

Der morgendliche Urin von 958 Probanden von 0 bis 80 Jahre beiderlei Geschlechts wurde verwendet. Es handelt sich um gesunde oder kranke Patienten mit oder ohne Medikation der Nervenlinik, Kinder- und Jugendpsychiatrie, der Kinderklinik und der Medizinischen Klinik der Universität Marburg sowie dem Richtsberg-Kindergarten Marburg.

Die Diagnosen der Patienten aus der Universitäts-Nervenlinik und Jugendpsychiatrie wurden nach (8,38) wie folgt aufgeschlüsselt in:

|                                 |                                                                                                                         |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Arteriosklerose:                | Insult, ischämische Attacken, Basilarisinsuffizienz, Apoplexie                                                          |
| Wirbelsäulenaaffektionen:       | LWS/HWS-Syndrom, Bandscheibenprolaps, Zustand nach Bandscheibenoperation, Bandscheibendegeneration                      |
| Psychosen:                      | emotional-hyperästhetisches Syndrom, Psychopathie, organisches Psychosyndrom, Zykllothymie, endogene Depression         |
| Paranoia:                       | Schizophrenien                                                                                                          |
| Neurosen:                       | Involutionsdepression, reaktive Depression, neurotische Fehlentwicklung, Suizidversuch, Angstzustände, Anorexia nervosa |
| Verhaltensstörungen:            | Enuresis, Mutismus, Legasthenie, Phobien, Autismus                                                                      |
| Demenzen:                       | Hirnatrophie, hirnorganischer Abbau, Wesensänderung                                                                     |
| Alkohol- und Medikamentenabusus |                                                                                                                         |
| Epilepsien                      |                                                                                                                         |
| Entzündungen des Gehirns:       | Meningitis, Encephalitis, Encephalopathie, Lues cerebrospinalis                                                         |
| Schädel-Hirntrauma:             | Contusio, Commotio, frühkindlicher Hirnschaden                                                                          |

|                                |                                                  |
|--------------------------------|--------------------------------------------------|
| Tumoren des Gehirns:           | Cauda-Tumor, Glioblastom, Meningiom, Sella-Tumor |
| Affektionen der Basalganglien: | Morbus Parkinson                                 |

Die Diagnosen der Patienten aus der Medizinischen Klinik und der Kinderklinik der Universität Marburg wurden unterteilt in:

|                                         |                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Herz-Kreislauf-Erkrankungen:            | Myocardinfarkt, Herzrhythmusstörungen, angeborene Herzfehler, Aortenstenose und -insuffizienz, Cor pulmonale, Herzinsuffizienz, Lungenembolie |
| Magen-Darm-Erkrankungen:                | Dyspepsie, Coeliakie, Gastroenteritis, Enteropathie, Salmonellose, Morbus Crohn, Ulcera ventriculi et duodeni, Erbrechen, Pylorusstenose      |
| Leber-Erkrankungen:                     | Hepatitis, Cholangitis, Hämosiderose, andere Leberschäden                                                                                     |
| Lungen-Erkrankungen:                    | Bronchitis, Pneumonie, Tumoren, Asthma bronchiale, respiratorische Insuffizienz                                                               |
| Nieren-Erkrankungen:                    | nephrotisches Syndrom, Nierenversagen (akut, chronisch), Harnwegsinfekt                                                                       |
| Erkrankungen des blutbildenden Systems: | Leukosen, Sphärocytose, Anämie, hämolytischer Ikterus, Mononukleose, Morbus Hodgkin, Plasmocytom                                              |
| Stoffwechsel-Erkrankungen:              | Hyperthyreose, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Adipositas                                                                                  |

## II. Vorbereitung des Urins

Zur Bestimmung des Glycosaminoglycangehaltes nach Whiteman (42) bzw. mittels Toluidinblau wird von dem frischen Urin sofort ein Milliliter entnommen. Dazu wird der Urin in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der Eppendorf-Zentrifuge vier Minuten lang bei 15000 x g zentrifugiert. Von dem Überstand werden 0,02 ml für den Screening-Test, 0,10 ml für die Bestimmung nach Whiteman und 0,20 ml zur Kreatinin-Bestimmung entnommen.

II.1 Bestimmung des Kreatiningehaltes und weiterer Bestandteile des Urins.

Der Kreatiningehalt des Urins wird in den Verdünnungen 1/20 und 1/50 (Urin/aqua bidest) mit dem Auto-Analyser (Technicon I) mit folgenden Reagenzien bestimmt: gesättigte Pikrinsäure (Merck), NaOH: 0,5 M (Merck), NaCl: 0,15 M (Merck), Kreatininstandard: 1 g Kreatinin/l, (Technicon).

II.2 Nachweis von Glucose im Harn.

Glucose wird nach Firmenvorschrift mit Clinistix (Ames Nr. 2844) nachgewiesen.

II.3 Nachweis von Urobilinogen im Harn.

Urobilinogen wird mit Uroblastix (Ames) nachgewiesen.

II.4 Untersuchung des Urinsediments.

Der Urin wird bei 300 U/Min abzentrifugiert und bis auf den Bodensatz verworfen. Ein Tropfen des Bodensatzes wird auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckgläschen versehen und im Zeiss-Mikroskop bei vierzigfacher Vergrößerung angesehen. Aus dem Befund mehrerer Blickfelder wird der Mittelwert gebildet. Normaler Befund: 0-5 Leukozyten, 0-1 Erythrozyten, Urate, vereinzelt Plattenepithelien.

II.5 Griess'sche Probe auf nitritbildende Bakterien.

Nach Bestimmung des Sedimentes wird in das Sedimentgläschen ca 1 ml Griess-Ilosvays-Reagenz gegeben. Bei positiver Reaktion verfärbt sich der Bodensatz sofort hell- bis dunkelrot.

### III. Methoden zur Bestimmung von Glycosaminoglycanen im Urin

#### 1.) Semi-quantitativer Screening-Test mit Toluidin-Blau getränktem Papier

Reagenzien: Mucopolysaccharide Papers, Ames Company,  
Division Miles Laboratories Inc., Elkhart,  
Indiana 46514, No. 7550  
Stammlösung: 0,10 ml Eisessig, 20,00 ml  
Methanol (Merck p.A.), 200,00 ml aqua bidest

Methode:

##### Testansatz 1:

In die Mitte des MPS Papiers wird mit einer Eppendorf-Pipette 0,02 ml des vorbereiteten Urins gegeben. Man lässt die Flüssigkeit 3 Min. bei Zimmertemperatur auf einem Sieb eintrocknen, damit kein Verlust von Urin durch Diffusion in eine saugfähige Unterlage (z.B. Papier) eintritt.

Dann wird das Papier in eine bis zur Hälfte mit Stammlösung gefüllte Petri-Schale gegeben und 10 Min. mit einem Magnetrührer in der Stammlösung bewegt. Danach wird das Papier kurz zwischen Filterpapier gelegt und zum Trocknen bei Zimmertemperatur auf eine nicht saugfähige Unterlage gebracht. Das Ergebnis kann nach ungefähr 30 Min. am getrockneten Papier abgelesen werden. Bei positivem Ergebnis muss in der Mitte des MPS Papiers eine hell- bis dunkelviolette Verfärbung zu erkennen sein. Bei negativem Ergebnis behält das MPS Papier seine blaue Eigenfarbe.

##### Testansatz 2:

In die Mitte des MPS Papiers wird mit einer Eppendorf-Pipette 0,005 ml des vorbereiteten Urins gegeben. Man lässt die Flüssigkeit 3 Min. eintrocknen (s. Testansatz 1)

und gibt noch dreimal 0,005 ml Urin auf das Papier. Waschen mit der Stammlösung und Trocknen erfolgt wie bei Testansatz 1.

Standards: Von Seikagaku (Miles Seravac) wurden folgende Standards bezogen:

Chondroitin-6-sulfat 2 mg/ml,

Chondroitin-4-sulfat 2 mg/ml,

Dermatansulfat 2 mg/ml

und folgende wässrige Verdünnungen hergestellt: 0,50 g/l, 0,25 g/l, 0,10g/l, 0,075 g/l, 0,05g/l, 0,01 g/l

2.) Quantitative Bestimmung von Glycosaminoglycanen im Urin mit Alcian Blue 8GX nach Whiteman (42)

Reagenzien: Alcian Blue 8GX, Difco, West Molesey, Surrey, U.K.

Manoxol IB (Dibutylester Natriumsulfosuccinat), B.D.H. Chemicals Ltd., Poole, Dorset, U.K.

Natrium-Acetat, Merck p.A., wasserfrei, Magnesiumchlorid, Merck p.A.,

Aethanol, Merck p.A.,

Schwarzbandfilter Nr. 589<sup>1</sup> Ø 150 mm (Schleicher und Schüll).

Methode:

Herstellen des Reaktionsgemisches:

0,05 Alcian Blue werden in 100 ml 50 mM Na-Acetat- und 50 mM  $MgCl_2$  -Lösung gelöst. Der pH der Acetat- $MgCl_2$ -Lösung wird mit 0,1 N Essigsäure auf pH 5,8 am pH-Meter (Fa. Knick) eingestellt. Der Chloridgehalt der  $Mg-Cl_2$ -Lösung wird mit dem Chloridmeter (EEL 920 Chloride Meter) kontrolliert.

### Herstellen der Manoxol-Lösung:

40 g Manoxol werden in 100 ml 50 mM Na-Acetat (pH 5,8) gelöst und durch einen Schwarzbandfilter filtriert. Die Manoxol-Lösung wird bei Zimmertemperatur (21°C) aufbewahrt.

### Testansatz A (vgl. Whiteman (42)):

Leerwert: 0,05 ml aqua bidest

Probenvolumen: 0,05 ml

Reaktionsgemisch: 1,0 ml

Das Probenvolumen wird in Zentrifugengläsern aus Kunststoff mit 1,0 ml Reaktionsgemisch versetzt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wird 15 Min. mit 2000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz in 2,0 ml Äthanol suspendiert. Wieder wird 15 Min. zentrifugiert und der Niederschlag in 1,0 ml Manoxol gelöst. Die Reagenzgläser werden bis zur vollständigen Lösung des Niederschlages geschüttelt (Wirbel-Mix). Die Lösung hat dann eine schwach- bis starkblaue Farbe. Die Extinktion wird gegen Luft am Eppendorf-Photometer 6115 S bei  $\lambda = 623 \text{ nm}$  und  $d = 1 \text{ cm}$  abgelesen.

### Testansatz B:

Leerwert: 0,05 ml aqua bidest

Probenvolumen: 0,05 ml

Reaktionsgemisch: 1,0 ml

Das Probenvolumen wird in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 1,0 ml Reaktionsgemisch versetzt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wird in der Eppendorf-Zentrifuge mit 15000 x g 4 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und verworfen, der Niederschlag in 1,0 ml Äthanol suspendiert und wie oben abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Der zweimal gewaschene Niederschlag wird dann in 1,0 ml Manoxol-Lösung gelöst. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden kräftig geschüttelt bis zur

vollständigen Lösung des Niederschlags. Die Lösung hat dann eine schwach- bis starkblaue Farbe. Die Extinktion wird am Eppendorf-Photometer bei  $\lambda = 623$  nm und  $d=1$  cm gegen Luft abgelesen.

Testansatz C:

Leerwert: 0,05 ml aqua bidest

Probenvolumen: 0,05 ml

Reaktionsgemisch: 1,0 ml

Testansatz C unterscheidet sich von Testansatz B durch eine kürzere Inkubation von 30 Min. Die Extinktion wird am Eppendorf-Photometer bei  $\lambda = 623$  nm und  $d=1$  cm gegen Luft abgelesen.

3.) Aufnahme von Spektren gefärbter Glycosaminoglycane im Testansatz A und B.

Es werden mittels Testansatz A und B zwei Chondroitin-Sulfat-B Lösungen ( $6 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ ) hergestellt. Am Zeiss-Spektral-Photometer PMQ II werden die Extinktionen gegen Luft im Wellenlängenbereich  $\lambda = 400-700$  nm in Schritten von je 20 nm bei  $d=1$  cm gemessen (s.Abb.1.).

#### IV. Eichlösungen

Chondroitinsulfat-A bzw. Chondroitin-4-sulfat (Seikagaku Miles-Seravac): Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Chondroitinsulfat-B bzw. Dermatansulfat (Seikagaku): Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Chondroitinsulfat-C bzw. Chondroitin-6-sulfat (Seikagaku): Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Chondroitinsulfat Na-Salz (Fa.Baker): Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Hyaluronsäure K-Salz (Serva): Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Heparansulfat<sup>+</sup>: Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Heparin<sup>+</sup> Na-Salz: Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;  
Keratansulfat<sup>+</sup>: Stammlösung 2 mg/ml, Verdünnung 0,2 mg/ml;

Uronsäuren- und Hexosamingehalt obiger Standards wurden ohne vorherige Trocknung der Substanz ermittelt (vgl.BV ).

---

<sup>+</sup> Schenkung von Dr. A. Dorfman, Chicago, Illinois, U.S.A.

## V. Bausteinanalysen von Glycosaminoglycanen

### 1.) Methode zum Nachweis von Uronsäuren (nach Bitter und Muir (4) )

Reagenzien:

Schwefelsäurereagenz: 0,025 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$  p.A.  
in konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p.A. ( $d=1,84$ ) gelöst.

Carbazol-Reagenz: 0,125 g Carbazol purum, Merck, in  
100 ml Aethanol (96%) gelöst.

Standard: D(+) Glucurono-3, 6-Lacton (Fa. Baker, Gross-  
Gerau)

Methode:

Probenvolumen: 1,0 ml

Leerwert: 1,0 ml aqua bidest

Schwefelsäure-Reagenz: 5,0 ml

Carbazol-Reagenz: 0,2 ml

Die Reagenzgläser werden im Eisbad vorgekühlt und mit je 5,0 ml Schwefelsäure-Reagenz beschickt. Hinzugefügt wird 1,0 ml des zu untersuchenden Materials, das ggf. mit aqua bidest verdünnt worden ist. Zur Vermeidung grösserer Wärmeentwicklung wird vorsichtig im Eisbad gemischt. Dann kommen die Reagenzgläser für 10 Min. in ein kochendes Wasserbad. Anschliessend werden sie im Wasserbad gekühlt. Jetzt wird zu jeder Probe 0,2 ml Carbazol-Reagenz hinzugegeben und zweimal kräftig auf dem Wirbelmix gemischt. Nach nochmaligem 15 minütigen Kochen im Wasserbad wird am Eppendorf-Photometer bei  $\lambda = 546 \text{ nm}$  und  $d=1$  die Extinktion gegen Luft abgelesen.

In diesem Ansatz hat  $1 \mu\text{M}$  Uronsäure =  $3,06 E_{546 \text{ nm}}^{d=1}$ .

### 2.) Methode zur Bestimmung von Hexosaminen (Elson-Morgan-Reaktion, Antonopoulos et al. (1) )

Reagenzien:

Acetyl-Aceton-Reagenz: 3 Teile Acetyl-Aceton (Merck p.A.)

in 97 Teilen  $1.25 \text{ M Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$

Ehrlich's Reagenz: 2,5 g p-Dimethyl-amino-Benzaldehyd

(Merck p.A.) in 30 ml konzentrierter HCl (37%ig) und

30 ml Aethanol p.A. (96%ig)

Aethanol (Merck p.A.)

Standardlösung: D-Glucosamin-HCl als wässriger Standard

(Fa. Serva, Heidelberg)

#### Methode:

a) Hydrolyse der Proben

b) Ausführung der Bestimmung:

Probevolumen: 0,25 ml

Acetyl-Aceton-Reagenz: 0,5 ml

Aethanol: 2,0 ml

Ehrlich's Reagenz: 0,25 ml

Proben und Leerwerte (0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) werden in 6 N HCl

6 Stunden bei  $100^\circ \text{C}$  hydrolisiert (Gesamtvolumen: 1 ml),

sodann in einem Rotationsverdampfer eingengt und in 1 ml

aqua bidest aufgenommen. Nach nochmaligem Lösen in Wasser

und Einengen werden Proben und Leerwert in 0,25 ml Wasser

gelöst und mit 0,5 ml Acetyl-Aceton-Reagenz gemischt. An-

schliessend werden die Reagenzgläser mit Stopfen und

Klammern verschlossen und für 60 Min. in ein Wasserbad

mit  $90^\circ \text{C}$  ( $\pm 1^\circ \text{C}$ ) gestellt. Nach Abkühlung im Leitungs-

wasserbad werden zu jeder Probe 2,0 ml Aethanol und 0,25

ml Ehrlich's Reagenz gegeben und mit dem Wirbelmix gut ge-

mischt. Da die Reaktion zeitabhängig ist, müssen Aethanol

und Ehrlich's Reagenz so zu den Proben gegeben werden, dass

bis zum Ablesen der Extinktion 30 Min. eingehalten werden.

Die Extinktion wird am Zeiss-Spektral-Photometer bei

$\lambda = 535 \text{ nm}$ ,  $d = 2 \text{ cm}$  und Blende 0 abgelesen.

In diesem Ansatz hat  $\mu\text{M Hexosamin} = 12,47 E_{535 \text{ nm}}^{d=2}$ .

## VI. Statistische Methoden

Mit Hilfe einer Diehl Combitron S Rechenmaschine mit Sonderprogramm wurden folgende Berechnungen angestellt: Mittelwert  $\bar{x}$  mit Standardabweichung  $s$ , Variationskoeffizient  $V$  sowie Student-t-Wert ergaben sich aus folgenden Formeln:

$$\bar{x} = \frac{1}{n_x} \cdot \sum x_i$$

$$s_x^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n_x} = \sum x_i^2 - \bar{x} \cdot \sum x_i$$

$$V = \frac{s_x \cdot 100}{\bar{x}}$$

$$r_{\bar{x}-\bar{y}} = s_x + y \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} = s \sqrt{\frac{n_x + n_y}{n_x \cdot n_y}}$$

$$t = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{r_{\bar{x}} - \bar{y}}$$

$x_i$  : Einzelwert

$n_x, n_y$  : Anzahl der Werte im Kollektiv

$\bar{x}, \bar{y}$  : arithmetisches Mittel der Werte

$s_x, s_y$  : Standardabweichung beider Kollektive

$V$  : Variationskoeffizient

$r_{\bar{x} - \bar{y}}$  : Streuung der Differenz der arithmetischen Mittel

$t$  : Student-t-Test

Unterschiede im Sedimentbefund im Vergleich zu den übrigen Ergebnissen wurden mit dem  $\chi^2$  Vierfeldertest auf Signifikanz untersucht (vgl. 29); jedoch nur in drei Fällen lag die Signifikanz über dem 5%-Bereich. Deshalb sollen hier Einzelheiten nicht gebracht werden.

## C ERGEBNISSE

### I. Methodenvergleiche

#### 1.) Quantitative Bestimmung von Glycosaminoglycanen mit Alcian Blue 8GX mit Ansatz A,B,C

Wie aus den Spektren der Abb.1 ersichtlich ist, wird mit Ansatz A (Originalmethode nach Whiteman (42)) ein Farbextinktionsoptimum des gelösten Alcian Blue-Dermatansulfatkomplexes bei 623 nm erhalten, ebenso mit der modifizierten Methode Ansatz B. Weiterhin bringen die modifizierten Ansätze B und C vergleichbare Extinktionsausbeuten, z.B. für Dermatansulfat (vgl. Abb.2), sodass mit der schnelleren Methode C alle folgenden Untersuchungen durchgeführt werden.

Eichsubstanzen verschiedener Glycosaminoglycane ergeben mit Ansatz C jedoch unterschiedliche Extinktionsausbeuten (s. Abb. 2, Tab. 1): Während die hier untersuchten Chondroitinsulfate die höchsten Extinktionen bringen (um 100 pro mg Substanz), fallen die Ausbeuten der übrigen Glycosaminoglycane im folgenden Verhältnis ab: Keratansulfat 80, Hyaluronsäure 65, Heparansulfat und Heparin 50-60. Ausserdem laufen die Eichkurven von Chondroitin-4- und -6-sulfat, Dermatansulfat (Ansatz B und C) und von Keratansulfat durch den Nullpunkt, nicht dagegen die Kurven von Hyaluronsäure und Heparansulfat (Abb. 2).

Da aus der Literatur (s. Einleitung) bekannt ist, dass im menschlichen Urin überwiegend ein Gemisch aus Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Dermatansulfat ausgeschieden wird, wird ein mittlerer Extinktionskoeffizient nur für diese Substanzen errechnet und im Folgenden verwendet.

Abb. 1. Spektrum des Alcian-Blue-8GX-Glycosaminoglycan-komplex im Ansatz A und B (je 6  $\mu\text{g}$  Dermatan-sulfat).

Weitere Einzelheiten s. Methodik III.3.

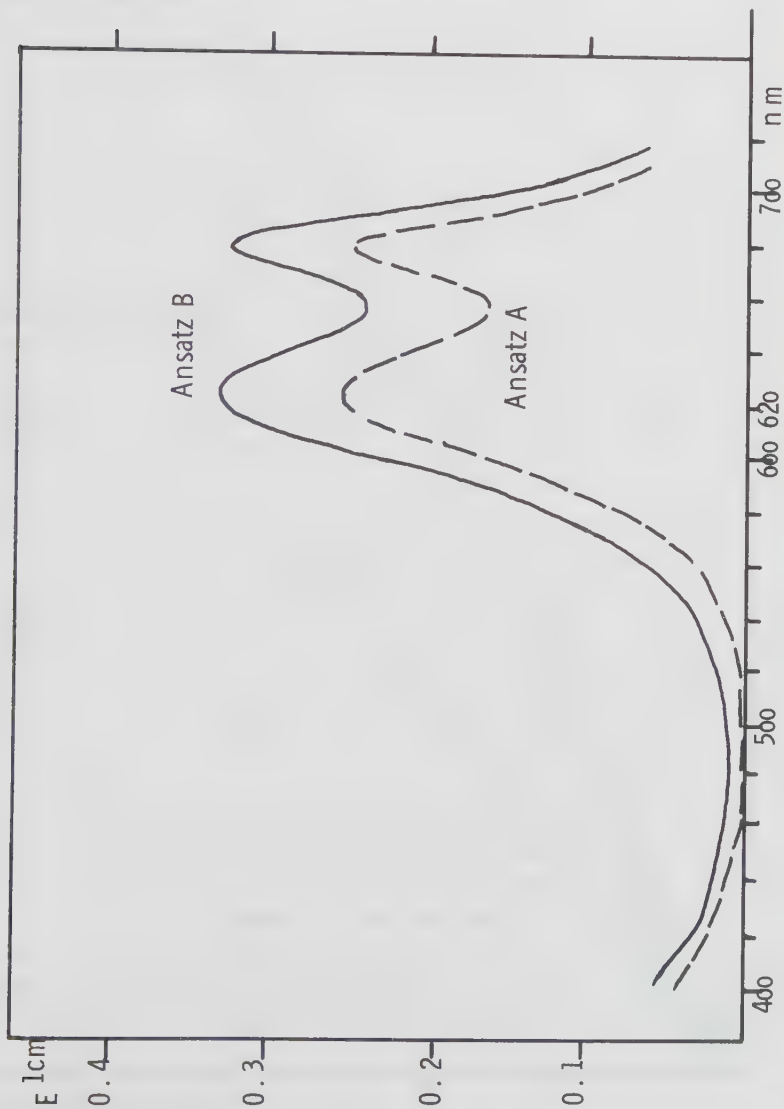
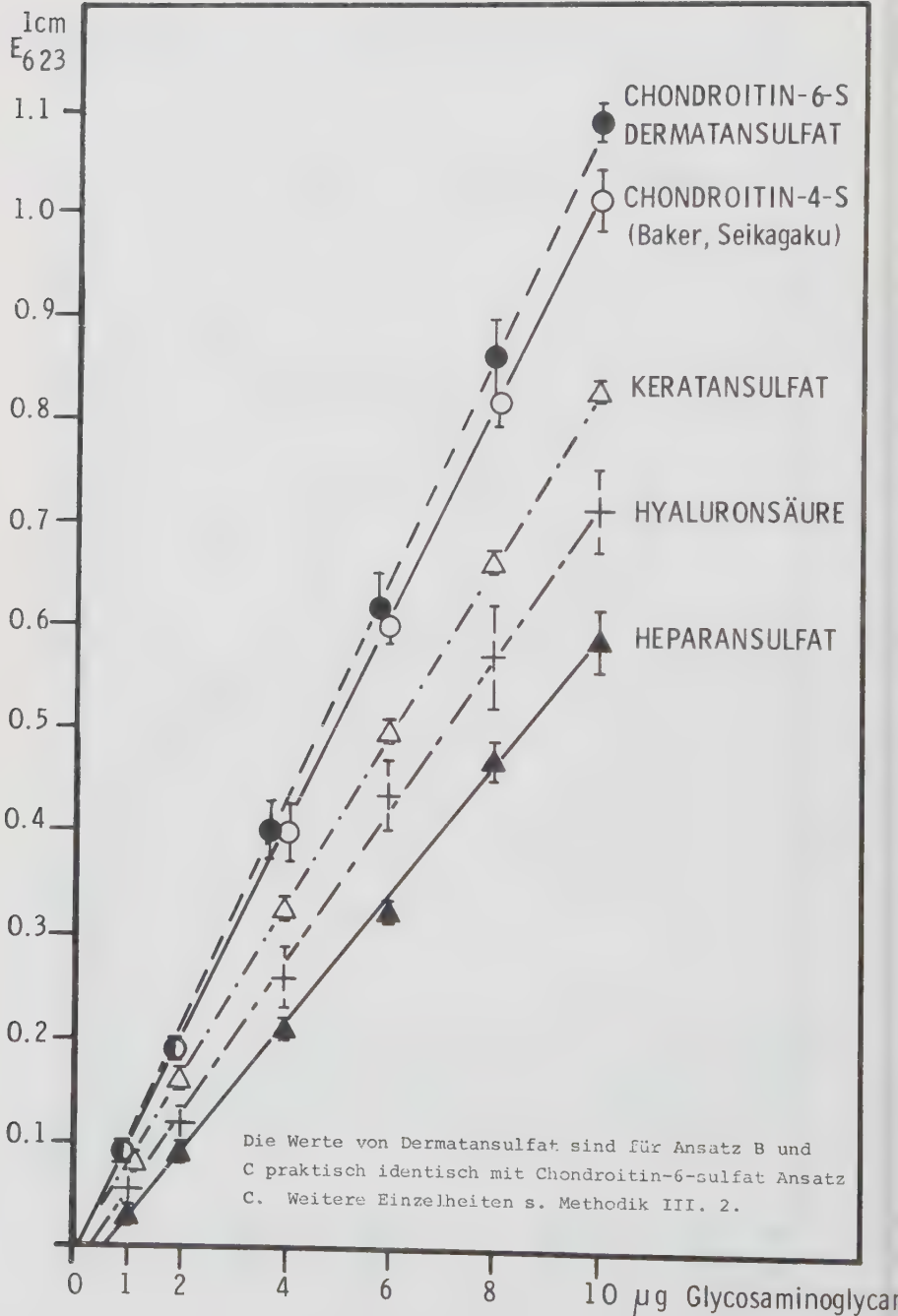


Abb. 2. Eichkurven für einige Glycosaminoglycanstandards.



| Substanz                                     | $E_{623}^{1 \text{ cm}}$<br>Substanz | Variations-<br>koeffizient | $\mu\text{Mol Uronsäure}$<br>(Glucosamin)<br>pro mg Substanz |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Chondroitin-4-<br>sulfat (A)                 | 0,094<br>$\pm 0,006$                 | 6,4                        | 1,48                                                         |
| Dermatansulfat<br>(Chondroitin-<br>sulfat B) | 0,103<br>$\pm 0,009$                 | 8,7                        | 1,48                                                         |
| Chondroitin-6-<br>sulfat (C)                 | 0,098<br>$\pm 0,009$                 | 9,2                        | 1,46                                                         |
| Baker-<br>Chondroitin-<br>sulfat             | 0,096<br>$\pm 0,006$                 | 6,2                        | 1,46                                                         |
| Keratan-<br>sulfat                           | 0,080<br>$\pm 0,005$                 | 6,3                        | 1,32                                                         |
| Hyaluron-<br>säure                           | 0,065<br>$\pm 0,006$                 | 9,2                        | 1,89                                                         |
| Heparan-<br>sulfat                           | 0,052<br>$\pm 0,004$                 | 7,7                        | 1,64                                                         |
| Heparin                                      | 0,058<br>$\pm 0,010$                 | 17,2                       | 1,41                                                         |

Tab. 1. Extinktionskoeffizienten verschiedener reiner Glycosaminoglycane (Standards) aufgestellt mittels der Alcian Blue 8GX-Methode (Ansatz C) sowie Variationskoeffizient dieser Methode und Uronsäure- bzw. Glycosamingehalt der Standards.

2.) Semi-quantitativer Screening-Test mit Toluidin-Blau-Papier im Vergleich zur quantitativen Alcian Blue-Methode

Dieser Screening-Test wird mit einer abfallenden Konzentrationsreihe dreier Chondroitinsulfate (Chondroitin-4-, -6-sulfat, Dermatansulfat) geeicht (Abb. 3) und festgestellt, dass durch mehrmaliges Auftragen einer kleinen Menge eine höhere lokale Konzentration auf dem Papier erreicht wird und damit eine grössere Empfindlichkeit (bis 0,05 g/l).

Der Vergleich der mit diesem semi-quantitativen Screening-Test erhaltenen Glycosaminoglycankonzentration im Urin von gesunden und kranken Probanden (Tab. 5,7,9,11,13,15, 27) mit denjenigen Konzentrationen, welche mittels der quantitativen Alcian Blue 8GX-Methode (Ansatz C) gemessen worden sind (Tab. 3,6,8,10,12,14,16), zeigt eindeutig eine grössere Empfindlichkeit und Genauigkeit der letzteren Methode.

II. Charakterisierung der Alcian Blue 8GX-Methode (Ansatz C)

Die Wiederauffindungsrate dieser Methode mit Baker's Chondroitinsulfat liegt zwischen 98-113% (Tab. 2), der Variationskoeffizient unter 10% (Tab. 1), d.h.  $< 0,1 \mu\text{g}$  Chondroitinsulfat. Die Präzision von Tag zu Tag schwankt um  $\pm 0,3 \mu\text{g}$  (Abb. 4). Für  $1 \mu\text{g}$  Glycosaminoglycan errechnet sich aus den Extinktionswerten von Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Dermatansulfat (Tab.1):

$$1 \mu\text{g Glycosaminoglycan} = 0.097 \pm 0.009 \text{ E}^1 \frac{\text{cm}}{623 \text{ nm}}$$

und aus den Uronsäuregehalten dieser Substanzen (Tab.1):

$$1 \mu\text{g Glycosaminoglycan} = 1,47 \mu\text{Mol Uronsäure.}$$

Damit kann die Glycosaminoglycankonzentration im Urin, ermittelt durch die Alcian Blue-Methode, in  $\mu\text{Mol}$  Uronsäure der ausgeschiedenen Glycosaminoglycane annäherungsweise transformiert werden.

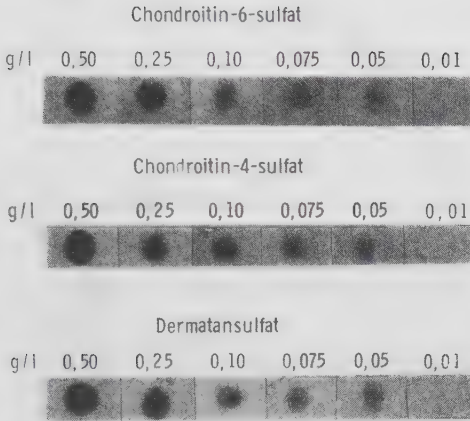


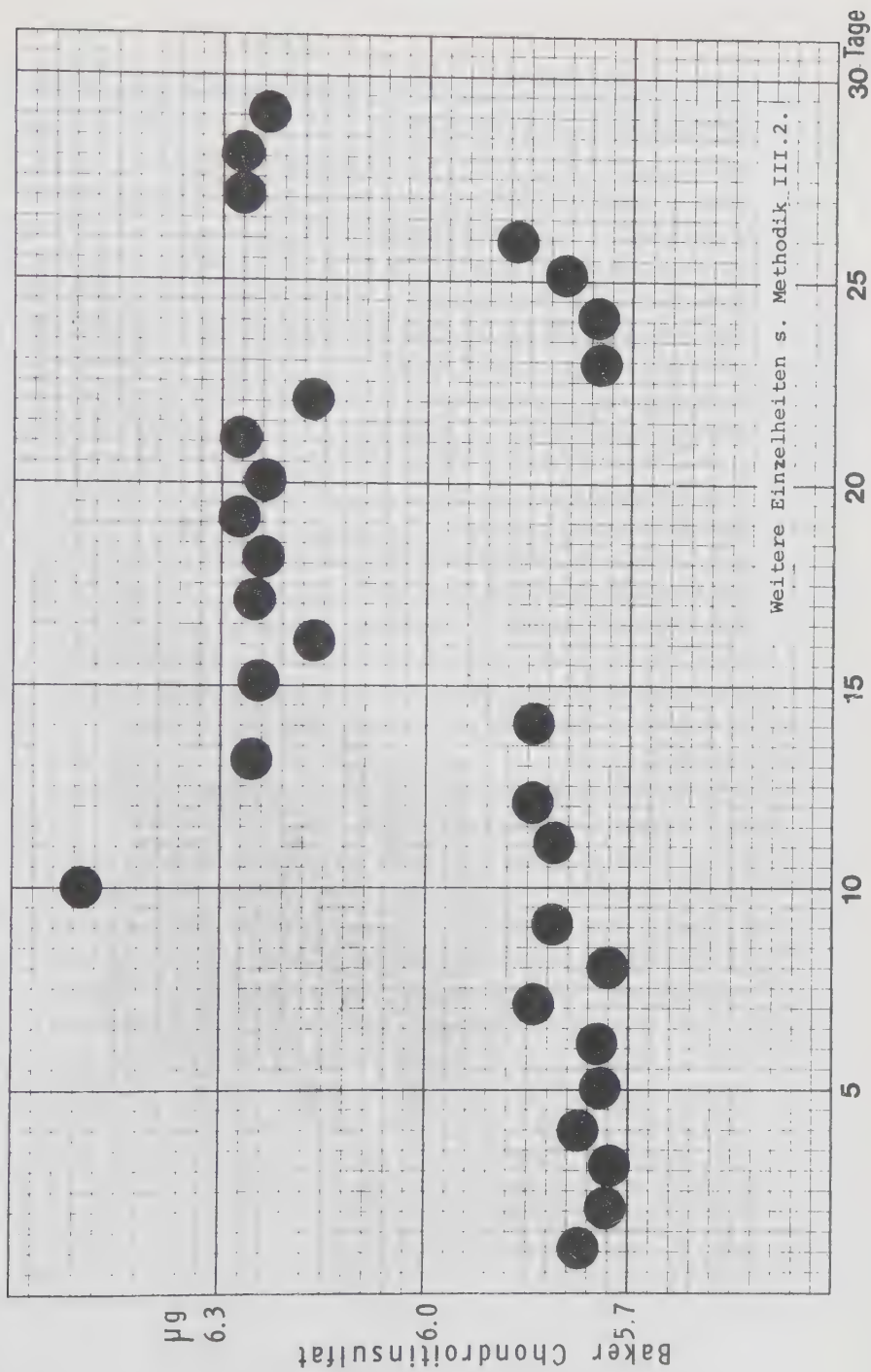
Abb. 3. Semi-quantitativer Screening-Test mit Toluidin-Blau-Papier (Testansatz 2).

Eichung mit 3 Chondroitinsulfatstandards.

| Urin            | Standard | H <sub>2</sub> O | E <sub>623</sub> <sup>d=1</sup> -Leerwert | Wiederfindungs-<br>rate % |
|-----------------|----------|------------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| Urin A<br>40 µl | -        | 10 µl            | 0,100                                     |                           |
| -               | 10 µl    | 40 µl            | 0,160                                     |                           |
| 40 µl           | 10 µl    | -                | 0,293                                     | 113%                      |
| Urin B<br>40 µl | -        | 10 µl            | 0,190                                     |                           |
| -               | 10 µl    | 40 µl            | 0,199                                     |                           |
| 40 µl           | 10 µl    | -                | 0,382                                     | 98%                       |

Tab. 2. Wiederauffindung im Urin von Baker Chondroitin-sulfat mittels der Alcian Blue 8GX-Methode Ansatz C

Abb. 4. Präzision von Tag zu Tag des quantitativen Screening-  
Tests für Glycosaminoglycane (Ansatz C).



### III. Aufstellung von Normalwerten für die modifizierte Alcian Blue 8GX-Methode (Ansatz C)

Ein Normalbereich für die Glycosaminoglycanausscheidung im Urin wird für 143 Personen beiderlei Geschlechts im Alter von 0 - 80 Jahren aufgestellt, und zwar in mg Glycosaminoglycan bzw. Uronsäure der Glycosaminoglycane pro Liter (Tab. 3) und auf die ausgeschiedene Kreatininmenge (g/l) bezogen (Tab. 3,4). Die ausgeschiedene Glycosaminoglycanmenge (mg/l bzw.  $\mu\text{Mol}$  Uronsäure/l) ist in den Altersgruppen 0 - 1 und 1 - 10 Jahren am höchsten, um dann mit zunehmendem Alter abzufallen (Abb. 5). Ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Personen konnte nicht festgestellt werden. Da die Kreatininausscheidung zwischen 0 - 10 Jahren um mehr als die Hälfte niedriger liegt als bei älteren Probanden, sind die Glycosaminoglycan/Kreatininquotienten bzw. Uronsäure/Kreatininquotienten für jüngere Probanden (0 - 10 Jahre) 3 bis 10 mal höher als bei älteren (10 - 80 Jahre, Tab.4). Die Kreatininkonzentrationen im Urin liegen im untersuchten Kollektiv im Normalbereich (44).

### IV. Die Ausscheidung von Glycosaminoglycanen bei Probanden mit verschiedenen Erkrankungen

Bei den in Tabellen 6,8,10,12,14,16 untersuchten Krankheiten von 815 Probanden lassen sich fast ohne Ausnahme gegenüber dem ermittelten Normbereich deutlich 1.5- bis 4fach erhöhte Glycosaminoglycanausscheidungsraten feststellen, bei einer Pfaundler-Hurler-Erkrankung 10fach höhere (Tab. 8). Ausnahmen sind: eine Muskeldystrophie (Tab. 10) und eine Nierenerkrankung (Tab.12), die gegenüber der Norm erniedrigte Ausscheidungsraten aufweisen. Da die gleichzeitig untersuchte Kreatininkonzentration im Urin grösstenteils auch deutlich erhöht ist, werden im Normbereich liegende Glycosaminoglycan/Kreatininquotienten bzw. Uronsäure/Kreatininquotienten erhalten für folgende

| Alters-<br>klassen<br>(Jahre) | Glykosamino-<br>glykane |                 | t     | Uronsäuren der<br>Glykosaminoglykane |                 | t     | Kreatinin     |               | t     |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------|-------|--------------------------------------|-----------------|-------|---------------|---------------|-------|
|                               | ♂                       | ♀               |       | ♂                                    | ♀               |       | ♂             | ♀             |       |
| 0-1<br>(n=16)                 | 40,55<br>±20,90         | 37,74<br>±12,23 | <0,8  | 59,41<br>±30,62                      | 56,08<br>±17,20 | <0,8  | 0,35<br>±0,31 | 0,13<br>±0,05 | <0,8  |
| 1-10<br>(n=20)                | 42,83<br>±10,85         | 48,10<br>±11,68 | <0,4  | 62,60<br>±16,00                      | 70,47<br>±17,11 | <0,4  | 0,67<br>±0,24 | 0,74<br>±0,27 | <0,4  |
| 10-20<br>(n=16)               | 31,52<br>±14,74         | 31,73<br>±14,74 | <0,89 | 46,17<br>±17,48                      | 46,48<br>±21,59 | <0,99 | 1,58<br>±0,63 | 1,12<br>±0,27 | <0,99 |
| 20-40<br>(n=24)               | 23,56<br>±7,71          | 19,63<br>±6,13  | <0,2  | 34,51<br>±11,30                      | 28,75<br>±8,98  | <0,2  | 1,60<br>±0,77 | 1,32<br>±0,55 | <0,2  |
| 40-60<br>(n=38)               | 19,69<br>±6,57          | 20,75<br>±7,90  | <0,3  | 29,12<br>±9,44                       | 30,40<br>±11,56 | <0,8  | 1,67<br>±0,73 | 1,26<br>±0,47 | <0,8  |
| 60-80<br>(n=29)               | 22,41<br>±9,57          | 20,45<br>±6,03  | <0,6  | 34,02<br>±13,74                      | 29,92<br>±8,79  | <0,4  | 1,05<br>±0,49 | 0,99<br>±0,44 | <0,4  |

Tab. 3 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit vom Lebensalter.  
Die Glykosaminoglykane wurden mittels Methode C gemessen. Mittelwerte mit Standardabweichung und statistischer Vergleich der Mittelwerte für männliche und weibliche Personen mittels des t-Testes nach Student.

| Alter-<br>klassen<br>(Jahre) | mg Glykosamino-<br>glykane / g<br>Kreatinin |              | µM Uronsäuren /<br>mm Kreatinin |                  |
|------------------------------|---------------------------------------------|--------------|---------------------------------|------------------|
|                              | $\bar{x}$                                   | t            | $\bar{x}$                       | t                |
| 0-1<br>(n=16)                | 172<br>± 136                                | 234<br>± 150 | 228,66<br>± 22,82               | 47,19<br>± 24,93 |
| 1-10<br>(n=20)               | 70<br>± 23                                  | 72<br>± 17   | 11,64<br>± 4,84                 | 11,31<br>± 3,02  |
| 10-20<br>(n=16)              | 21<br>± 10                                  | 26<br>± 10   | 3,42<br>± 1,91                  | 4,32<br>± 1,72   |
| 20-40<br>(n=24)              | 17<br>± 10                                  | 16<br>± 5    | 2,83<br>± 1,93                  | 2,80<br>± 0,73   |
| 40-60<br>(n=32)              | 13<br>± 6                                   | 16<br>± 6    | 2,25<br>± 0,97                  | 2,73<br>± 0,22   |
| 60-80<br>(n=29)              | 23<br>± 7                                   | 21<br>± 10   | 3,82<br>± 1,25                  | 3,46<br>± 1,75   |

Tab. 4 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Die Glykosaminoglykane wurden mittels Methode C gemessen. Mittelwerte mit Standardabweichung und statistischer Vergleich der Mittelwerte für männliche und weibliche Personen mittels des t-Testes nach Student.

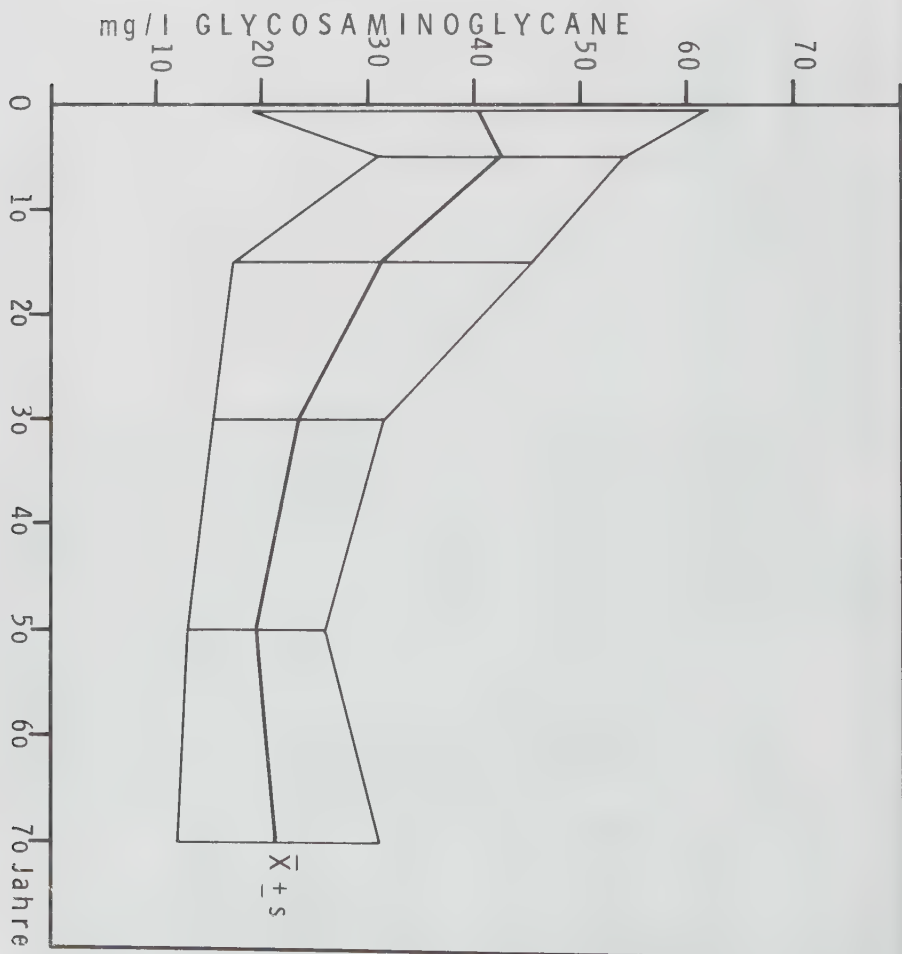
| Alter<br>und<br>Geschlecht   | GLYKOSAMINOGLYKANE<br>g/l |      |      |       |       | SEDIMENT (Häufigkeit positiver Befunde) |                     |              |                 |                   |
|------------------------------|---------------------------|------|------|-------|-------|-----------------------------------------|---------------------|--------------|-----------------|-------------------|
|                              | 0,50                      | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05  | Schleim                                 | Griess-<br>Reaktion | Kristalle    | Leuko-<br>zyten | Erythro-<br>zyten |
| 0-1 (n=16)<br>8 ♂<br>8 ♀     | -                         | -    | 1/16 | 4/16  | 10/16 | -<br>-                                  | 7/8<br>5/8          | 2/8<br>1/8   | -<br>-          | -<br>-            |
| 1-10 (n=20)<br>13 ♂<br>7 ♀   | -                         | -    | -    | 4/20  | 10/20 | 4/13<br>-                               | 1/13<br>1/7         | 1/13<br>1/7  | 1/13<br>-       | 1/13<br>-         |
| 10-20 (n=16)<br>7 ♂<br>9 ♀   | -                         | -    | 2/16 | 2/16  | 4/16  | 4/7<br>2/9                              | -<br>-              | 2/7<br>3/9   | 2/7<br>2/9      | -<br>-            |
| 20-40 (n=24)<br>10 ♂<br>14 ♀ | -                         | -    | -    | -     | 4/24  | 3/10<br>2/14                            | -<br>2/14           | -<br>4/14    | -<br>2/14       | -<br>-            |
| 40-60 (n=38)<br>23 ♂<br>15 ♀ | -                         | -    | -    | -     | 3/38  | 8/23<br>1/15                            | 3/23<br>3/15        | 5/23<br>4/15 | 1/23<br>4/15    | -<br>1/15         |
| 60-80 (n=29)<br>19 ♂<br>10 ♀ | -                         | -    | -    | -     | 1/29  | 7/19<br>2/10                            | 1/19<br>1/10        | 2/19<br>4/10 | 1/19<br>3/10    | 2/19<br>2/10      |

Tab. 5

Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von gesunden Kontrollpersonen verschiedenen Alters.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III.1 bestimmt.

Abb. 5. Glycosaminoglycankonzentration im Urin von gesunden Personen verschiedenen Alters.

Weitere Einzelheiten s. Methodik III.2.



Krankheiten: für 7 Dyspepsien bei Kleinkindern (0 - 1 Jahr alt Tab. 6), für 9 Verhaltensstörungen, 3 Magen-Darmerkrankungen, 3 Krampfleiden, 4 Infektionen, 2 Traumata und 1 Tumor bei Kindern (1 - 10 Jahre, Tab. 8), für 3 Stoffwechselkrankheiten bei Jugendlichen (10 - 20 Jahre Tab. 10), für 4 Psychosen, 4 Neurosen, 1 Nieren- und 1 Infektionskrankung bei 20 - 40 Jahre bzw. 40 - 60 Jahre alten Patienten (Tab. 12,14).

Bei anderen Krankheitsgruppen zeigen diese Quotienten gegenüber dem Normbereich signifikant erniedrigte Werte: Retardierung bei 2 Kleinkindern (Tab. 6), 2 Nierenerkrankungen bei Kindern (Tab. 8), oder signifikant erhöhte Werte bei älteren Probanden (10 - 80 Jahre, Tab. 10,12,14,16): Krampfleiden, Verhaltensstörungen, Magen-Darmerkrankungen, Tumoren, Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Kreislauf-, Lungen- und Bluterkrankungen sowie Gehirnaffektionen.

| Diagnosen                | Glykosamino-<br>glykane |         | Uronsäuren der<br>Glykosamino-<br>glykane |         | Kreatinin      |         | mg Glykosamino-<br>glykane/ g<br>Kreatinin |         | µM Uronsäuren/<br>mM Kreatinin |         |
|--------------------------|-------------------------|---------|-------------------------------------------|---------|----------------|---------|--------------------------------------------|---------|--------------------------------|---------|
|                          | mg/l                    | t       | µM/l                                      | t       | g/l            | t       |                                            | t       |                                | t       |
| Kontrollen<br>(n=16)     | 39,15<br>± 16,61        |         | 57,75<br>± 24,05                          |         | 0,25<br>± 0,25 |         | 230<br>± 150                               |         | 37,92<br>± 24,90               |         |
| Dyspepsie<br>(n=7)       | 104,89<br>± 49,01       | < 0,001 | 153,79<br>± 71,88                         | < 0,001 | 0,49<br>± 0,30 | < 0,5   | 242<br>± 88                                | < 0,05  | 40,23<br>± 14,60               | < 0,05  |
| Retardierung<br>(n=2)    | 134,83<br>± 11,79       | < 0,001 | 197,52<br>± 17,28                         | < 0,001 | 0,86<br>± 0,18 | < 0,001 | 160<br>± 45                                | < 0,001 | 26,62<br>± 7,70                | < 0,001 |
| Bronchitis<br>(n=1)      | 77,66                   |         | 113,77                                    |         | 0,19           |         | 408                                        |         | 67,76                          |         |
| Unklares Fieber<br>(n=1) | 105,06                  |         | 153,91                                    |         | 0,96           |         | 109                                        |         | 18,14                          |         |

Tab.6 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von 0 - 1 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts im Vergleich zu gesunden Kontrollen.  
Mittelwerte mit Standardabweichung und statistischer Vergleich der Mittelwerte mit Kontrollen mittels des t-Testes nach Student.

| Diagnosen                | GLYKOSAMINOGLYKANE<br>g/l |      |      |       |       | SEDIMENT ( Häufigkeit positiver Befunde ) |                 |           |            |              |
|--------------------------|---------------------------|------|------|-------|-------|-------------------------------------------|-----------------|-----------|------------|--------------|
|                          | 0,50                      | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05  | Schleim                                   | Griess-Reaktion | Kristalle | Leukozyten | Erythrozyten |
| Kontrollen<br>(n=16)     | -                         | -    | 1/16 | 4/16  | 10/16 | -                                         | 12/16           | 3/16      | -          | -            |
| Dyspepsie<br>(n=7)       | -                         | 1/7  | 4/7  | 2/7   | -     | 1/7                                       | 3/7             | 3/7       | -          | -            |
| Retardierung<br>(n=2)    | -                         | -    | 2/2  | -     | -     | -                                         | 1/2             | 1/2       | -          | 1/2          |
| Bronchitis<br>(n=1)      | -                         | -    | 1/1  | -     | -     | -                                         | -               | 1/1       | -          | -            |
| Unklares Fieber<br>(n=1) | -                         | -    | 1/1  | -     | -     | -                                         | 1/1             | -         | -          | -            |

Tab. 7 : Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von 0 - 1 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III. 1 bestimmt.

| Diagnosen                                       | Glykosamino-<br>glykane |         | Uronsäuren der<br>Glykosamino-<br>glykane |         | Kreatinin     |         | mg Glykosamino-<br>glykane/ g<br>Kreatinin |         | µM Uronsäuren/<br>mM Kreatinin |        |
|-------------------------------------------------|-------------------------|---------|-------------------------------------------|---------|---------------|---------|--------------------------------------------|---------|--------------------------------|--------|
|                                                 | mg/l                    | t       | µM/l                                      | t       | g/l           | t       |                                            | t       |                                | t      |
| Kontrollen<br>(n=20)                            | 44,50<br>+11,08         |         | 65,08<br>+16,31                           |         | 0,70<br>+0,24 |         | 70<br>+20                                  |         | 11,73<br>+ 4,28                |        |
| Verhaltensstörun-<br>gen, Retardierung<br>(n=9) | 88,02<br>+23,42         | < 0,001 | 124,93<br>+ 34,87                         | < 0,001 | 1,28<br>+0,49 | < 0,005 | 71<br>+41                                  | < 0,001 | 12,99<br>+ 4,43                | < 0,5  |
| Nier enerkrankun-<br>gen<br>(n=2)               | 75,40<br>+ 5,83         | < 0,001 | 110,45<br>+ 8,53                          | < 0,005 | 2,60<br>+1,27 | < 0,005 | 33<br>+17                                  | < 0,05  | 5,56<br>+ 3,10                 | < 0,1  |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=3)           | 94,76<br>+37,01         | < 0,001 | 138,82<br>+ 54,22                         | < 0,001 | 1,33<br>+0,47 | < 0,005 | 72<br>+20                                  | < 0,9   | 12,05<br>+ 3,53                | < 0,9  |
| Krampfleider<br>(n=3)                           | 110,35<br>+ 53,69       | < 0,001 | 161,66<br>+ 78,65                         | < 0,001 | 1,78<br>+0,72 | < 0,001 | 62<br>+10                                  | < 0,6   | 10,19<br>+ 1,87                | < 0,6  |
| Infektionen<br>(n=4)                            | 97,28<br>+30,49         | < 0,001 | 142,52<br>+ 44,66                         | < 0,001 | 1,30<br>+0,18 | < 0,001 | 73<br>+17                                  | < 0,9   | 12,22<br>+ 2,89                | < 0,9  |
| Traumata<br>(n=2)                               | 97,54<br>+26,07         | < 0,001 | 142,90<br>+ 38,20                         | < 0,001 | 1,52<br>+0,65 | < 0,005 | 86<br>+14                                  | < 0,4   | 80,83<br>+9,83                 | < 0,01 |
| Pfauncle-Hurle-<br>Erkrankung(n=1)              | 441,66                  |         | 647,04                                    |         | 1,30          |         | 340                                        |         | 56,30                          |        |
| Tumorer<br>(n=1)                                | 133,08                  |         | 194,96                                    |         | 2,22          |         | 60                                         |         | 9,93                           |        |
| Hepatitis<br>(n=1)                              | 71,28                   |         | 104,42                                    |         | 0,59          |         | 120                                        |         | 20,08                          |        |

Tab. 8 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von 1-10 Jahre  
 11. B. Patienten mit 1-10 Jahren im Vergleich zu gesunden Kontrollen

|                                                | 0,50 | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05  | Schleim | Griess-Reaktion | Kristalle | Leukozyten | Erythrozyten |
|------------------------------------------------|------|------|------|-------|-------|---------|-----------------|-----------|------------|--------------|
| Kontrollen<br>(n=20)                           | -    | -    | -    | 4/20  | 10/20 | 4/20    | 2/20            | 2/20      | 1/20       | 1/20         |
| Verhaltensstörungen,<br>Retardierung<br>(n=13) | -    | -    | 8/13 | 2/13  | 3/13  | 11/13   | -               | 2/13      | -          | -            |
| Nierenerkrankungen<br>(n=2)                    | -    | -    | 1/2  | 1/2   | -     | -       | -               | 1/2       | -          | -            |
| Magen-Darm-Erkrankungen<br>(n=4)               | -    | -    | 2/4  | 2/4   | -     | -       | -               | 2/4       | 1/4        | -            |
| Krampfleiden<br>(n=3)                          | -    | 1/3  | -    | 2/3   | -     | 2/3     | -               | -         | -          | -            |
| Infektionen<br>(n=4)                           | -    | -    | 2/4  | 2/4   | -     | -       | -               | 1/4       | -          | 1/4          |
| Traumata<br>(n=2)                              | -    | -    | 2/2  | -     | -     | 2/2     | -               | 2/2       | -          | -            |
| Pfaundler-Hurler-Erkrankung<br>(n=1)           | 1/1  | -    | -    | -     | -     | -       | -               | -         | -          | -            |
| Tumoren<br>(n=1)                               | -    | 1/1  | -    | -     | -     | 1/1     | -               | 1/1       | -          | -            |
| Hepatitis<br>(n=1)                             | -    | -    | -    | 1/1   | -     | -       | 1/1             | 1/1       | -          | -            |

Tab. 9

: Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von 1 - 10 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III.1 bestimmt.

| Diagnosen                         | Glykosaminoglykane |         | Uronsäuren der Glykosaminoglykane |         | Kreatinin      |       | mg Glykosaminoglykane/ g Kreatinin |         | µM Uronsäuren/ mM Kreatinin |         |
|-----------------------------------|--------------------|---------|-----------------------------------|---------|----------------|-------|------------------------------------|---------|-----------------------------|---------|
|                                   | mg/l               | t       | µM/l                              | t       | g/l            | t     |                                    | t       |                             | t       |
| Kontrollen<br>(n=16)              | 31,64<br>± 13,18   |         | 46,35<br>± 19,30                  |         | 1,32<br>± 0,51 |       | 20<br>± 10                         |         | 3,93<br>± 1,81              |         |
| Infektionen<br>(n=1)              | 151,62             |         | 222,12                            |         | 2,70           |       | 56                                 |         | 9,31                        |         |
| Krampfleiden<br>(n=2)             | 90,12<br>± 7,72    | < 0,001 | 132,03<br>± 11,31                 | < 0,001 | 2,10<br>± 1,30 | < 0,5 | 52<br>± 28                         | < 0,01  | 13,45<br>± 11,60            | < 0,01  |
| Verhaltensstörungen<br>(n=9)      | 74,82<br>± 18,03   | < 0,001 | 109,61<br>± 26,41                 | < 0,001 | 1,82<br>± 0,94 | < 0,6 | 48<br>± 14                         | < 0,001 | 11,28<br>± 5,88             | < 0,001 |
| Magen-Darm-Erkrankungen<br>(n=1)  | 113,30             |         | 165,98                            |         | 2,10           |       | 54                                 |         | 8,94                        |         |
| Stoffwechselerkrankungen<br>(n=3) | 80,68<br>± 44,43   | < 0,005 | 118,20<br>± 65,08                 | < 0,005 | 2,24<br>± 0,50 | < 0,2 | 35<br>± 10                         | < 0,1   | 6,78<br>± 1,03              | < 0,02  |
| Muskeldystrophie<br>(n=1)         | 7,00               |         | 10,26                             |         | 1,35           |       | 5                                  |         | 0,86                        |         |

Tab. 10 :

Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von 10-20 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts im Vergleich zu gesunden Kontrollen, Mittelwerte mit Standardabweichung und statistischer Vergleich der Mittelwerte mit Kontrollen mittels des t-Testes nach Student.

| Diagnosen                              | GLYKOSAMINOGLYKANE<br>g/l |      |      |       |      | SEDIMENT ( Häufigkeit positiver Befunde ) |                     |           |                 |                   |
|----------------------------------------|---------------------------|------|------|-------|------|-------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|-------------------|
|                                        | 0,50                      | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05 | Schleim                                   | Griess-<br>Reaktion | Kristalle | Leuko-<br>zyten | Erythro-<br>zyten |
| Kontrollen<br>(n=16)                   | -                         | -    | 2/16 | 2/16  | 4/16 | 6/16                                      | -                   | 5/16      | 4/16            | -                 |
| Infektionen<br>(n=1)                   | -                         | 1/1  | -    | -     | -    | 1/1                                       | -                   | 1/1       | -               | -                 |
| Verhaltens -<br>störungen<br>(n=9)     | -                         | -    | 4/9  | 3/9   | 2/9  | 3/9                                       | 1/9                 | 1/9       | -               | -                 |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=1)  | -                         | 1/1  | -    | -     | -    | -                                         | -                   | -         | -               | -                 |
| Stoffwechseler-<br>krankungen<br>(n=3) | -                         | 1/3  | 1/3  | 1/3   | -    | 1/3                                       | -                   | -         | -               | -                 |
| Muskeldystrophie<br>(n=1)              | -                         | -    | -    | -     | -    | -                                         | -                   | 1/1       | -               | -                 |
| Krampfleiden<br>(n=2)                  | -                         | -    | 1/2  | 1/2   | -    | 2/2                                       | 2/2                 | 1/2       | -               | -                 |

Tab. 11 : Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von 10 - 20 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III.1 bestimmt.

| Diagnosen                             | Glykoseamino-<br>glykane |         | Uronsäuren der<br>Glykosamino-<br>glykane |         | Kreatinin      |         | mg Glykosamino-<br>glykane/ g<br>Kreatinin |        | µM Uronsäuren/<br>mM Kreatinin |        |
|---------------------------------------|--------------------------|---------|-------------------------------------------|---------|----------------|---------|--------------------------------------------|--------|--------------------------------|--------|
|                                       | mg/l                     | t       | µM/l                                      | t       | g/l            | t       |                                            | t      |                                | t      |
| Kontrollen<br>(n=24)                  | 24,35<br>± 7,00          |         | 31,31<br>± 10,26                          |         | 1,44<br>± 0,65 |         | 20<br>± 10                                 |        | 2,81<br>± 1,37                 |        |
| Psychosen<br>(n=4)                    | 35,02<br>± 18,14         | < 0,02  | 51,30<br>± 26,57                          | < 0,02  | 2,60<br>± 1,10 | < 0,1   | 12<br>± 1                                  | < 0,4  | 2,08<br>± 0,55                 | < 0,4  |
| Neurosen<br>(n=4)                     | 42,44<br>± 7,84          | < 0,001 | 62,17<br>± 11,49                          | < 0,001 | 3,25<br>± 0,28 | < 0,005 | 13<br>± 1                                  | < 0,5  | 2,15<br>± 0,27                 | < 0,4  |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=3) | 39,09<br>± 4,63          | < 0,001 | 59,29<br>± 8,78                           | < 0,001 | 1,47<br>± 0,76 | < 0,025 | 30<br>± 10                                 | < 0,02 | 5,31<br>± 2,47                 | < 0,02 |
| Nierenerkrankungen<br>(n=1)           | 10,30                    |         | 15,09                                     |         | 0,50           |         | 21                                         |        | 3,41                           |        |
| Tumoren<br>(n=1)                      | 45,73                    |         | 66,99                                     |         | 3,20           |         | 14                                         |        | 2,37                           |        |
| Infektionen<br>(n=1)                  | 64,06                    |         | 93,85                                     |         | 4,02           |         | 16                                         |        | 2,64                           |        |

Tab. 12 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von 20-40 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Mittelwerte mit Standardabweichung und statistischer Vergleich der Mittelwerte mit Kontrollen mittels des t-Testes nach Student.

| Diagnosen                        | GLYKOSAMINOGLYKANE<br>g/l |      |      |       |      |      | SEDIMENT ( Häufigkeit positiver Befunde ) |                |           |            |              |
|----------------------------------|---------------------------|------|------|-------|------|------|-------------------------------------------|----------------|-----------|------------|--------------|
|                                  | 0,50                      | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05 |      | Schleim                                   | Griess-Reaktor | Kristalle | Leukozyten | Erythrozyten |
| Kontrollen<br>(n=24)             | -                         | -    | -    | -     | 4/24 | 0,05 | 5/24                                      | 2/24           | 4/24      | 2/24       | -            |
| Psychosen<br>(n=4)               | -                         | -    | -    | 1/4   | 2/4  |      | -                                         | 1/4            | 4/4       | -          | -            |
| Neurosen<br>(n=4)                | -                         | -    | -    | -     | 3/4  |      | 3/4                                       | -              | 3/4       | 1/4        | -            |
| Magen-Darm-Erkrankungen<br>(n=3) | -                         | -    | -    | -     | 1/3  |      | 2/3                                       | -              | -         | -          | -            |
| Nierenerkrankungen<br>(n=1)      | -                         | -    | -    | -     | -    |      | -                                         | -              | -         | -          | -            |
| Tumoren<br>(n=1)                 | -                         | -    | -    | -     | 1/1  |      | -                                         | -              | -         | -          | -            |
| Infektionen<br>(n=1)             | -                         | -    | -    | 1/1   | -    |      | 1/1                                       | -              | -         | -          | -            |

Tab. 13 : Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von 20 - 40 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III.1 bestimmt.

| Diagnosen                               | Glykosamino-<br>glykane |        | Uronsäuren<br>der Glykosa-<br>minoglykane |         | Kreatinin      |         | mg Glykosamino-<br>glykane/ g<br>Kreatinin |         | µM Uronsäuren/<br>mM Kreatinin |        |
|-----------------------------------------|-------------------------|--------|-------------------------------------------|---------|----------------|---------|--------------------------------------------|---------|--------------------------------|--------|
|                                         | mg/l                    | t      | µM/l                                      | t       | g/l            | t       |                                            | t       |                                | t      |
| Kontrollen<br>(n=38)                    | 20,75<br>± 7,07         |        | 29,62<br>± 10,29                          |         | 1,51<br>± 0,67 |         | 10<br>± 10                                 |         | 2,45<br>± 0,93                 |        |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=2)   | 43,57<br>± 8,01         | < 0,05 | 63,83<br>± 11,74                          | < 0,001 | 2,17<br>± 1,59 | < 0,5   | 25<br>± 14                                 | < 0,001 | 4,23<br>± 2,48                 | < 0,05 |
| Tumoren, Neurofi-<br>bromatose<br>(n=5) | 40,34<br>± 5,53         | < 0,02 | 59,10<br>± 8,11                           | < 0,001 | 2,60<br>± 1,12 | < 0,05  | 18<br>± 10                                 | < 0,025 | 3,08<br>± 1,59                 | < 0,25 |
| Diabetes mellitus<br>(n=3)              | 32,34<br>± 22,99        | < 0,05 | 47,38<br>± 33,68                          | < 0,001 | 1,35<br>± 0,67 | < 0,05  | 22<br>± 10                                 | < 0,001 | 3,61<br>± 1,79                 | < 0,05 |
| Hyperthyreose<br>(n=3)                  | 25,45<br>± 24,21        | < 0,02 | 37,22<br>± 35,47                          | < 0,001 | 0,55<br>± 0,35 | < 0,05  | 43<br>± 14                                 | < 0,005 | 6,99<br>± 2,63                 | < 0,05 |
| Gehirnaffektionen<br>(n=4)              | 31,83<br>± 19,77        | < 0,02 | 46,62<br>± 28,97                          | < 0,001 | 2,11<br>± 1,24 | < 0,05  | 16<br>± 1                                  | < 0,001 | 2,69<br>± 0,63                 | < 0,25 |
| Kreislauffer-<br>krankungen<br>(n=1)    | 47,79                   |        | 70,01                                     |         | 2,10           |         | 23                                         |         | 3,77                           |        |
| Psychosen<br>(n=3)                      | 46,55<br>± 7,89         | < 0,01 | 68,20<br>± 11,56                          | < 0,001 | 2,50<br>± 0,07 | < 0,005 | 30<br>± 10                                 | < 0,9   | 3,32<br>± 1,45                 | < 0,2  |
| Bluterkrankungen<br>(n=2)               | 53,66<br>± 2,98         | < 0,05 | 78,61<br>± 4,37                           | < 0,05  | 1,52<br>± 0,27 | < 0,04  | 22<br>± 23                                 | < 0,001 | 6,13<br>± 1,16                 | < 0,04 |

Tab. 14 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von 40

| Diagnoser.                               | GLYKOSAMINOGLYKANE<br>g/l |      |      |       |      | SEDIMENT ( Häufigkeit positiver Befunde ) |                     |           |                 |                   |
|------------------------------------------|---------------------------|------|------|-------|------|-------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|-------------------|
|                                          | 0,50                      | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05 | Schleim                                   | Griess-<br>Reaktion | Kristalle | Leuko-<br>zyten | Erythro-<br>zyten |
| Kontrollen<br>(n=38)                     | -                         | -    | -    | -     | 3/38 | 9/38                                      | 6/38                | 9/38      | 5/38            | 1/38              |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=2)    | -                         | -    | -    | 1/2   | -    | 1/2                                       | -                   | 1/2       | -               | -                 |
| Tumoren, Neurofi -<br>bromatose<br>(n=5) | -                         | -    | -    | 2/5   | -    | 2/5                                       | -                   | -         | 1/5             | 2/5               |
| Diabetes mellitus<br>(n=3)               | -                         | -    | -    | 1/3   | -    | 2/3                                       | 1/3                 | -         | -               | -                 |
| Hyperthyreosen<br>(n=3)                  | -                         | -    | -    | -     | -    | -                                         | 1/3                 | -         | 1/3             | -                 |
| Gehirnauffektionen<br>(n=4)              | -                         | -    | -    | -     | 3/4  | 2/4                                       | -                   | -         | -               | -                 |
| Kreislauf-<br>krankungen<br>(n=1)        | -                         | -    | -    | -     | 1/1  | -                                         | -                   | 1/1       | -               | -                 |
| Psychosen<br>(n=3)                       | -                         | -    | -    | -     | -    | -                                         | -                   | -         | 1/3             | 1/3               |
| Bluterkrankungen<br>(n=2)                | -                         | -    | -    | -     | 2/2  | 1/2                                       | -                   | -         | 1/2             | -                 |

Tab. 15 : Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von 40 - 60 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III.1 bestimmt.

| Diagnosen                             | Glykosaminoglykane |         | Uronsäurender Glykosaminoglykane |         | Kreatinin      |        | mg Glykosaminoglykane/ g Kreatinin |         | µM Uronsäuren/ mM Kreatinin |         |
|---------------------------------------|--------------------|---------|----------------------------------|---------|----------------|--------|------------------------------------|---------|-----------------------------|---------|
|                                       | mg/l               | t       | µM/l                             | t       | g/l            | t      |                                    | t       |                             | t       |
| Kontrollen<br>(n=29)                  | 21,66<br>± 8,34    |         | 32,50<br>± 12,20                 |         | 1,03<br>± 0,47 |        | 20<br>± 10                         |         | 3,47<br>± 1,45              |         |
| Kreislauf-<br>krankungen<br>(n=8)     | 60,64<br>± 23,91   | < 0,002 | 88,84<br>± 35,03                 | < 0,001 | 1,58<br>± 0,47 | < 0,02 | 44<br>± 24                         | < 0,001 | 7,27<br>± 4,26              | < 0,001 |
| Tumoren<br>(n=1)                      | 48,82              |         | 71,22                            |         | 1,50           |        | 32                                 |         | 5,37                        |         |
| Gehirnaffektionen<br>(n=6)            | 35,61<br>± 5,84    | < 0,2   | 52,16<br>± 8,56                  | < 0,001 | 1,22<br>± 0,51 | < 0,25 | 33<br>± 14                         | < 0,001 | 5,52<br>± 2,74              | < 0,05  |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=1) | 40,72              |         | 59,75                            |         | 1,13           |        | 36                                 |         | 5,98                        |         |
| Lungenkrankun-<br>gen<br>(n=2)        | 56,25<br>± 28,97   | < 0,005 | 83,29<br>± 42,44                 | < 0,001 | 1,16<br>± 0,62 | < 0,2  | 49<br>± 24                         | < 0,001 | 8,11<br>± 4,27              | < 0,001 |
| Hypertkyreose<br>(n=2)                | 12,44<br>± 7,72    |         | 27,01<br>± 11,31                 |         | 0,54<br>± 0,09 |        | 49<br>± 10                         |         | 5,48<br>± 1,42              |         |

Tab. 16 : Die Konzentration von Glykosaminoglykanen, Uronsäuren und Kreatinin im Urin von 60 - 80 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Mittelwerte mit Standardabweichung und statistischer Vergleich der Mittelwerte mit Kontrollen mittels des t-Testes nach Student.

| Diagnosen                             | GLYKOSAMINOGLYKANE<br>g/l |      |      |       |      |      | SEDIMENT ( Häufigkeit positiver Befunde ) |                     |           |                 |                   |
|---------------------------------------|---------------------------|------|------|-------|------|------|-------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------|-------------------|
|                                       | 0,50                      | 0,25 | 0,10 | 0,075 | 0,05 |      | Schleim                                   | Griess-<br>Reaktion | Kristalle | Leuko-<br>zyten | Erythro-<br>zyten |
| Kontrollen<br>(n=29)                  | -                         | -    | -    | -     | 3/29 | 0,05 | 9/29                                      | 2/29                | 6/29      | 4/29            | 4/29              |
| Kreislauf-<br>krankungen<br>(n=8)     | -                         | -    | -    | 7/8   | 1/8  |      | 5/8                                       | -                   | -         | -               | -                 |
| Tumoren<br>(n=1)                      | -                         | -    | -    | -     | 1/1  |      | -                                         | -                   | -         | 1/1             | -                 |
| Gehirnauffektionen<br>(n=6)           | -                         | -    | -    | -     | 4/6  |      | 2/6                                       | 1/6                 | 1/6       | 2/6             | 1/6               |
| Magen-Darm-Er-<br>krankungen<br>(n=1) | -                         | -    | -    | 1/1   | -    |      | -                                         | -                   | -         | 1/1             | -                 |
| Lungenerkrankun-<br>gen<br>(n=3)      | -                         | -    | -    | 1/3   | 1/3  |      | 1/3                                       | -                   | -         | -               | 1/3               |
| Hyperthyreosen<br>(n=2)               | -                         | -    | -    | -     | -    |      | 2/2                                       | -                   | 1/2       | -               | -                 |

Tab. 17 : Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zum Sedimentbefund im Urin von 60 - 80 Jahre alten Patienten beiderlei Geschlechts.  
Die Glykosaminoglykane wurden nach Testansatz 2 in Methodik III.1 bestimmt.

## D DISKUSSION

In den letzten 20 Jahren sind verschiedenartige Screening-Tests für die Glycosaminoglycanausscheidung im menschlichen Urin beschrieben worden:

a) "Spot Test", das ist die Anfärbung einer bestimmten Menge von Gylcosaminoglycanen, auf Filterpapier aufgetrocknet, durch verschiedene kationische Farbstoffe, z.B. Toluidinblau (3), Alcianblau (5,18,27) oder Azur A (7), welche nach dem Trocknen der Probe aufgebracht werden. Diese Testanordnungen ergaben bis zu 30% falsch negative Ergebnisse (vgl. 27). Durch mehrmaliges Aufbringen einer kleinen Urinmenge (5 µl) wird in dieser Arbeit die lokale Glycosaminoglycankonzentration erhöht und damit die Empfindlichkeit und Genauigkeit dieser Methode. Bis zu 0,05 g Glycosaminoglycan pro Liter lassen sich mit dieser Methode noch nachweisen, was mit einem ähnlichen Verfahren mit Alcianblau bereits beschrieben worden ist (5).

Ein anderes Prinzip der Glycosaminoglycan-Messung stellt die Ausfällung dieser Substanzen mit Rinderalbumin in saurer Lösung (11) dar oder mit quaternären Ammoniumverbindungen (z.B. Cetylpyridiniumchlorid oder Cetyltrimethylammoniumbromid (16,31,26) und anschliessender turbidimetrischer semiquantitativer Messung der Präzipitate (vgl. 21). Die Ausfällung mit kationischen Farbstoffen (z.B. mit Alcian Blue 8GX (33,42) oder mit Toluidinblau (43) und anschliessender Messung des gelösten Farbstoff-Glycosaminoglycan-Komplexes oder die verbleibende Farbstoffkonzentration im Überstand (vgl. 43) ermöglicht ein quantitatives Messen der Uringlycosaminoglycane. Angeführt sei noch eine quantitative Methode, die auf der Absorptionsänderung des Glycosaminoglycan-Farbstoff-(N,N-Diethyl-pseudoisocyaniniodid)-Komplexes im Vergleich zum freien Farbstoff basiert (36,37). Während mit den semi-quantitativen Tests über falsch negative Ergebnisse berichtet worden ist (6,35), hat die

von Whiteman beschriebene quantitative Alcian Blue 8GX Methode den Vorteil, dass die Farbausbeute für verschiedene Chondroitinsulfate weitgehend gleich ist und Keratansulfat neben Hyaluronsäure und Heparansulfat messbar ist (vgl. 42), was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

Die in dieser Arbeit modifizierte Whiteman-Methode (14) zeigt eine sehr gute Wiederauffindung und Reproduzierbarkeit sowie eine gute von Tag-zu Tag-Präzision. Durch Anwendung des Eppendorf-Mikrolitersystems ist die Methode schneller und daher mit grösserer Probenanzahl durchführbar. Die hier aufgestellte Altersabhängigkeit der Glycosaminoglycankonzentration im menschlichen Urin (= höhere Werte bei 0-10 Jahre alten Kindern als bei Erwachsenen -) ist mit den oben angeführten Methoden bereits beschrieben worden (vgl. 17,24,25,37); jedoch sind die gemessenen Konzentrationen etwas höher als diejenigen mit der Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation ermittelten (vgl. 42), obwohl die Glycosaminoglycankonzentrationen, auf Kreatinin bezogen, weitgehend mit solchen in der Literatur (17,24,25) beschriebenen identisch sind. Dieser Unterschied kann möglicherweise auf eine bessere Ausbeute der Alcian Blue 8GX-Methode im Vergleich zu den anderen oben aufgeführten zurückgeführt werden.

Die Urinausscheidung von Glycosaminoglycanen ist bei verschiedenen Krankheiten erhöht: Neben den Mucopolysaccharidosen (Übersicht bei 23,34) zeigen aktive Systemerkrankungen wie progressive Sklerose (15,19), Polymyositis (19), Dermatomyositis (15,19), rheumatoide Arthritis (9) sowie Erkrankungen des Harntraktes (37), des Blutes (28), der Leber (13) eine erhöhte Gesamtausscheidung, was in dieser Arbeit weitgehend bestätigt werden kann. Darüberhinaus werden bei Dyspepsie des Kleinkindalters, Verhaltensstörungen, Psychosen, Krampfleiden und anderen Gehirnaffektionen eine erhöhte Ausscheidung pro Liter festgestellt sowie bei Infektionen, Magen-Darmerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes melli-

tus), Kreislauf- und Lungenerkrankungen sowie Tumoren. Diese erhöhten Werte normalisieren sich teilweise, wenn auf das ausgeschiedene Kreatinin, welches gleichzeitig erhöhte Werte im Urin zeigt, bezogen wird. Daraus ist zu schliessen, dass bei diesen Krankheiten nicht nur der Turnover von Glycosaminoglycanen der Bindegewebssubstanz erhöht ist, sondern auch der Kreatin-Kreatininstoffwechsel. Da in dieser Arbeit jedoch nur die Glycosaminoglycanausscheidung im Morgenurin gemessen worden ist und ein circadianer Ausscheidungsrythmus für diese Verbindungen im Urin bekannt ist (10,32), müssen weitere, in einem grösseren Rahmen durchgeführte Untersuchungen die klinischen Befunde der Arbeit bestätigen bzw. untermauern.

## E ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Es wird ein quantitativer Screening Test zur Messung der sauren Glycosaminoglycane im Urin des Menschen beschrieben, welcher schnell und gut reproduzierbar (Variationskoeffizient  $< 10\%$ ) mit der Eppendorf-Mikroliter-Methode in der Routine durchführbar ist (98-113% Wiederauffindungsrate, Präzision von Tag-zu Tag  $\pm 0,3 \mu\text{g}$ , Nachweisgrenze  $\sim 0,1 \mu\text{g}$  Chondroitinsulfate). Der Test beruht auf der von J. Scott (31) beschriebenen Ausfällung von sauren Glycosaminoglycanen mit dem kationischen Farbstoff Alcian Blue 8GX und photometrischer Messung des gelösten Komplexes nach Whiteman (42).
- 2.) Mit diesem Test werden an einem Kollektiv von 143 gesunden Personen beiderlei Geschlechts altersabhängige Normbereiche für die Glycosaminoglycanausscheidung aufgestellt und auf das gleichzeitig gemessene Kreatinin im Urin bezogen. 0 - 10 Jahre alte Kinder zeigen die höchste Ausscheidung pro Liter.
- 3.) Alle untersuchten Krankheitsbilder weisen eine 1,5- bis 4fach erhöhte Ausscheidung von Glycosaminoglycanen auf: Dyspepsie und Retardierung des Kleinkindes, bei älteren Probanden Erkrankungen des Stoffwechsels, des Magen-Darmtraktes, des Harntraktes, des Kreislaufsystems, des Blutes, der Lungen sowie diverse Traumata, Tumoren, Verhaltensstörungen, Psychosen und andere Gehirnaffektionen.

Da sich diese erhöhte Ausscheidung auf die Urinkonzentration des Kreatinins bezogen weitgehend normalisiert, kann auf erhöhte Turnover-Raten des Glycosaminoglycan- und Kreatin-Kreatininstoffwechsels bei diesen Krankheiten geschlossen werden.

- 4.) Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse werden mit einem käuflichen semi-quantitativen Screening Test (Toluidin-Blau getränktes Papier) verglichen, der mit aufsteigenden Konzentrationen von Chondroitinsulfaten geeicht worden ist. Es ergibt sich eine klare Überlegenheit des quantitativen Screening Alcian Blue Test gegenüber dem semiquantitativen Screening Test in Bezug auf Genauigkeit und Empfindlichkeit.

Literatur:

- 1) Antonopoulos, C.A., Gardell, S., Szirmai, J.A. and Tyssonsk, E.R., de: Biochem. Biophys. Acta 83 1 (1964)
- 2) Bermann, E.R., Vered, J. and Bach, G.: Clin. Chemie 17 (1971) 886-890
- 3) Berry, H.K. and Spinanger, J.: J. Lab. Clin. Med. 55 (1960) 136-138
- 4) Bitter, T. and Muir, H.: Analyt. Biochem. 4 (1962) 330-334
- 5) Carson, N.A.J. and Neill, D.W.: Arch. Dis. Childh. 37 (1962) 505-513
- 6) Carter, C.H., Wan, A.T. and Carpenter, D.G.: J. Pediat. 73 (1968) 217-221
- 7) Chakrapani, B. and Bachhawat, B.K.: Indian J. Biochem. 6 (1969) 166-168
- 8) Diagnoseschlüssel und Glossar psychiatrischer Krankheiten, 3. Aufl. Springer-Verlag Heidelberg 1973
- 9) DiFerrante, N.: J. Clin. Invest. 36 (1957) 1516
- 10) DiFerrante, N. and Lipcomb, H.S.: Clin. Chim. Acta 30 (1970) 69-72
- 11) Dorfman, A.: Pediatrics 22 (1958) 576-589
- 12) Holt, P.J.L.: Current topic in connective tissue disease, Churchill Livingstone, Edinburgh 1975
- 13) Kawata, H., Koizumi, T., Wada, R. and Yoshida, T.: Gastroenterology 40 (1961) 507-512
- 14) Kleine, T.O. and Fried, A.: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15 (1977) 167
- 15) Kreysel, H.W., Köhler, A. u. Kleine, T.O.: Klin. Wschr. 51 (1973) 214-221
- 16) Manley, G. and Hawksworth, J.: Arch. Dis. Childh. 41 (1966) 91-96
- 17) Manley, G., Severn, M. and Hawksworth, J.: J. clin. Path. 21 (1968) 339-345
- 18) McDonald, T.P., Lozzio, C. and Lotkin, P.: Clin. Pediat. 9 (1970) 272-276

- 19) Murata,K., Ishikawa,T. and Oshima,Y.: Clin.Chim.Acta 28  
(1970) 213-222
- 20) Orii,T.: Hoppe-Seyler', Z.Physiol.Chem. 346 (1968)  
816-822
- 21) Pennock,C.A.: J.Clin.Path. 22 (1969) 379
- 22) Pennock,C.A.: J.Clin.Path. 29 (1976) 111-123
- 23) Pennock,C.A. and Barnes,I.C.: J.Med.Genetics 13 (1976)  
169-189
- 24) Pennock,C.A., Wharton,B.A. and White,F.: Acta  
paediat. scand. 60 (1971) 299-300
- 25) Pennock,C.A., White,F. and Wharton,B.A.: Acta  
paediat. scand. 61 (1972) 125-127
- 26) Plooy,M. Du and Villiers,L.S.De: S.Afr-Med.J. 49 (1975)  
1038-1040
- 27) Procopsis, P.G., Turner,B., Ruxton,J.T. and Brown,D.A.:  
J.ment.Def.Res. 12 (1968) 13-17
- 28) Rich,C. and Meyers,W.P.L.: J.Lab.Clin.Med. 54 (1959) 223
- 29) Sachs,L.: Statistische Auswertungsmethoden, Springer-Verlag  
1968 S. 341 ff.
- 30) Schubert,M. and Hamermann,D.: A primer on connective tissue  
biochemistry, Lea & Febriger, Philadelphia 1967
- 31) Scott,J.E., Meth.biochem.Anal. 8 (1960) 145-197
- 32) Scott,J.E. and Newton,D.J.: Connective Tissue Research  
3 (1975) 157-164
- 33) Scott,J.E., Quintarelli,G. and Dellovo,M.C.: Histochemie 4  
(1964) 73-85
- 34) Spranger,J.: Orthopädie 3 (1974) 65-71
- 35) Steiness, I.B.: Pediatrics 27 (1961) 112-117
- 36) Suschke,J. Vogt,D. und Scheibe,P.: Fortschritte der  
Labordiagnostik 85 (1967) 911-912
- 37) Suschke,J., Vogt,D., Becker,B. und Vierling,R.: Arch.  
f.Kinderheilkunde 180 (1968) 28-37
- 38) Systematisches Verzeichnis der neurologisch-neurochirurgischen  
Krankheiten nebst Diagnoseschlüssel psychiatrischer Krank-  
heiten (Hrsgb. Deutsche Gesellsch.f.Neurologie) 1973

- 39) Varadi,D.P., Cifonelli,J.A. and Dorfman,A.:Biochim.  
Biophys.Acta 141 (1967) 103-117
- 40) Vaughan,J.M.: The Physiology of Bone. Clarendon Press,  
Oxford 1970
- 41) Wessler,E.: Biochem.J. 122 (1971) 373-384
- 42) Whiteman,P.: Biochem.J. 131 (1973) 343-350, 351-357
- 43) Wollensak,J.: Arch.Klin.exp.Ophthal. 177 (1969) 18-20
- 44) Wissenschaftliche Tabellen Hrgb: Geigy, Pharma,Basel, 1968

## Lebenslauf

Andrea Fried, geb. Mühl 62 Wiesbaden, Dotzheimer Str.41  
Tel. 30 31 86

geboren am: 7.12.1950  
in: Diez/Lahn

Konfession: evangelisch

Schulen: 1957-1961 Pestalozzi-Grundschule  
in Diez  
1961-1969 Marienschule, Limburg  
Abitur am 12.6.1969

Hochschulen: WS 1969/70 AfE Frankfurt  
SS 1970-SS 1972 Humanmedizin  
Frankfurt  
WS 1972/73-WS 1975/76  
Humanmedizin Marburg  
Staatsexamen am 18.12.75  
Beginn der wissenschaftlichen  
Arbeiten im klinisch-chemischen  
Labor der Neurologischen  
Klinik Marburg im Jahr 1973

Medizinalassistentzeit: 1.2.76-31.5.76 Chirurgische  
Klinik, Marburg  
1.6.76-31.1.77 Med.Poliklinik  
Marburg  
1.9.77-31.1.78 Kurklinik Wies-  
baden

Seit dem 9.2.1973 verheiratet mit dem Diplom-Volkswirt  
Ulrich Fried.

Am 15.12.1976 Geburt des 1. Kindes.

Andrea Fried

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren  
Professoren und Dozenten:

Antoni, Börngen, Bock, Buchholz, Daume, Dombrowski, Egbring,  
Eißner, Eschenbach, Exner, Friedrichs, Ganz , Gerdes, Gottes-  
büren, Graul, Grundner, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heene, Hort,  
Huch, Jacob, Kaffarnik, Kalbfleisch, Klaus, Klein, Kleine, Klein-  
sasser, Knauff, Kohlhage, Koranksky, Lange, Latta, Linneweh,  
Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat, Portig, Pots,  
Ranft, Riecken, Rodeck, Schmitz-Moormann, Schweckendieck,  
Siegert, Sodomann, Solcher, Stutte, Welge-Lüssen, Wendt,  
Willenbockel, Uhlarik.









